

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790493

研究課題名(和文) エボラウイルスの宿主細胞への侵入に関与する宿主因子の網羅的同定

研究課題名(英文) Comprehensive identification of host factors that involve in Ebolavirus entry

研究代表者

南保 明日香(Nanbo, Asuka)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60359487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エボラウイルス侵入機構の分子基盤を解明するため、本研究においては、侵入過程に関与する宿主因子の網羅的同定を目的として検討を行った。その結果、エボラウイルス様粒子(VLP)の細胞表面への吸着、ならびに細胞への取込み、エンドソーム膜との膜融合における効果を定量的に評価することに成功した。現在、ハイコンテンツイメージング機器を用いた系の最適化とsiRNAスクリーニングを計画している。今後、同定された各種候補因子の機能解析を進めることで、エボラウイルス侵入機構の分子基盤の理解、ならびに抗エボラウイルス薬の開発に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of Ebolavirus (EBOV) entry remains to be elucidated. The long-term goal of our study is the comprehensive identification of host factors that involve in EBOV entry by siRNA screening. By use of fluorescently-labeled EBOV viral-like particles (VLPs), we succeeded to quantify the efficiency of adsorption of VLPs onto cell membrane, internalization of VLPs, and membrane fusion with endosomes. Currently we are performing siRNA screening with high-content imaging system. Our study may provide a new notion to understand molecular mechanism of EBOV entry and also contribute to the development of therapeutics against EBOV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エボラウイルス侵入機構の分子基盤

1. 研究開始当初の背景

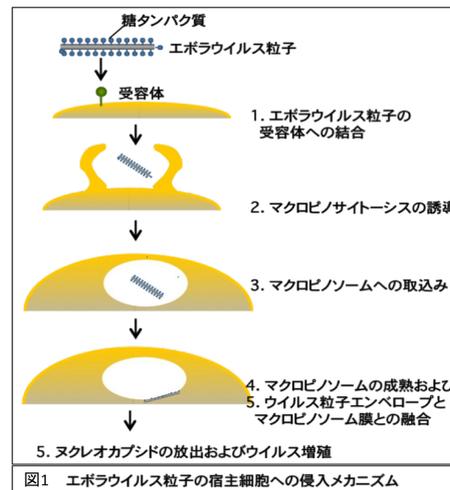
(1) エボラウイルスはフィロウイルス科に属するネガティブ1本鎖 RNA ウィルスである。エボラウイルス感染は極めて高い致死率を伴う重篤なエボラ出血熱を惹起し、アフリカにおける度重なるアウトブレイク、またはエボラウイルスを使用したバイオテロの可能性等の理由から早急に制圧しなくてはならない感染症の1つである。しかしながら、エボラウイルスの増殖を伴う作業には最高度安全実験施設(BSL4)を必要とし、このことはエボラウイルス研究発展の障壁となっている。さらに現時点においてエボラウイルス感染に対する有効な治療法は実用化されていない。

(2) ウィルスの多くはその増殖の場となる宿主細胞に侵入する際に、様々なエンドサイトーシス経路を利用することが知られている。従来、エボラウイルスは古典的エンドサイトーシス経路であるクラスリンまたはカベオラ依存的経路を介して細胞に侵入すると考えられていた。しかしながら、エボラウイルスはひも状の巨大な粒子を形成することが知られており、この粒子サイズはカベオラおよびクラスリン被覆ピットの内径と比較して非常に大きい。また、従来のエボラウイルス侵入に関する研究の多くは、シュドタイプウィルスの系を用いたものであり、実際のエボラウイルスの侵入経路を反映していない可能性があった。これに対して研究代表者は、エボラウイルスの形態を保持するエボラウイルス様粒子(VLP)を蛍光標識し、生細胞内への取込みを可視化する系を開発した。この系を用いてエボラウイルス粒子の細胞への取込み経路の解明を試みた結果、エボラウイルス粒子はウイルス由来糖タンパク質(GP)依存的にマクロピノサイトーシスによって宿主細胞に効率良く取り込まれることを証明した。さらに、取り込まれたウイルス粒子はマクロピノソームの成熟に伴い、ウイルス粒子エンベロップとエンドソーム膜との融合が生じることを明らかにした(図1, Nanbo *et al.* 2010)

2. 研究の目的

(1) フィロウィルスの集団感染は現時点においてアフリカに限定されているが、昨今の世界的な交通網の発達あるいはバイオテロにより、将来的に我が国において集団感染が勃発する可能性は否定できない。さらに、現時点においてフィロウイルス感染に対する有効な予防・治療薬は実用化されていない。抗フィロウイルス薬の開発において、宿主細胞への侵入過程は特異的な標的の1つと成りうる。

(2) 以上の背景およびこれまでの研究成果から得られた知見を基盤とし、エボラウイルス侵入に關与する宿主因子を網羅的に同定す

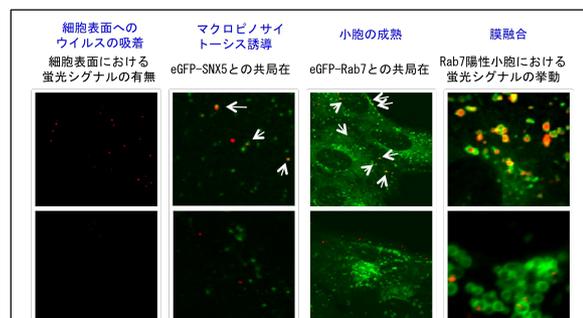


ることを目的として以下の検証を試みた。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者は先行研究において、エボラウイルス粒子の細胞への取込み経路が複数の過程から構成されることを明らかにした(図1)。すなわち、エボラウイルス粒子のGPを介した細胞膜への吸着、マクロピノサイトーシスの誘導およびマクロピノソームへのウイルス粒子の取込み、マクロピノソームの後期エンドソーム/リソソームへの輸送、およびウイルスエンベロップとエンドソーム膜の融合である。

(2) 先行研究において研究代表者が開発した生細胞イメージング系は、前述したエボラウイルス侵入を構成する各過程を個別に可視化することを可能とする。すなわち、VLPの細胞表面への吸着については、脂溶性トレーサーを用いて蛍光標識VLPを細胞に吸着させ、細胞表面において検出されるVLP由来の蛍光シグナルを評価する。マクロピノサイトーシスを介したVLPの細胞への取込みおよび、取り込まれたVLPのエンドソームへの輸送については、マクロピノサイトーシスによって生成されるエンドソーム(マクロピノソーム)および後期エンドソームマーカーであるSNX5およびRab7にeGFPを融合したタンパク質(eGFP-SNX5およびeGFP-Rab7)をそれぞれVero-E6細胞に発現させ、VLPとの共局在の効率を評価する。VLPのエンベロップとエンドソーム膜との融合については、Rab7陽性エンドソームにおける蛍光シグナル強度およびサイズの増強を評価する(図2)。



(3) エボラウイルス侵入過程のうち、エボラウイルス粒子の細胞表面への吸着、ウイルス粒子の細胞への取込み、ウイルス粒子のエンベロープとエンドソーム膜との融合プロセスに着目し、それぞれの過程における効率の定量化を試みた。

4. 研究成果

(1) エボラウイルス粒子の細胞表面への吸着効率の評価

エボラウイルスGP, 主要マトリックスタンパク質(VP40)、核タンパク質(NP)をヒト胎児腎臓由来HEK293T細胞に発現させ、培養上清に放出したVLPをショ糖密度勾配超遠心法によって精製した。次に、脂溶性トレーサーを用いてVLPを蛍光標識した。蛍光標識VLPをアフリカミドリザル腎臓由来Vero-E6細胞表面に室温で30分間吸着させた。培地を用いて細胞を洗浄後、細胞表面のVLP由来の蛍光シグナルを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出した。そして、画像解析ソフトウェアを用いて1細胞あたりに吸着したVLP数を定量した。この際、エボラウイルスの取込みに関する受容体の1つであるTIM-1に対する2種類の抗体(M224/1および α -TIM-1)を用いて、吸着に対する影響を検討した。その結果、各種抗体は共に有意にVLPの細胞への吸着を阻害することが明らかになった(図3、Kuroda *et al.*, *in press*)。

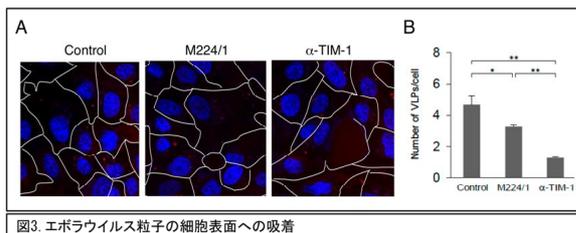


図3. エボラウイルス粒子の細胞表面への吸着

(2) エボラウイルス様粒子の細胞への取込み効率の評価

蛍光標識VLPを吸着後、培地を用いて洗浄し、37°Cで30分間インキュベーションすることで、細胞へ取り込ませた。トリプシン処理により、細胞表面に残存したVLPを除去後、細胞内のVLP由来の蛍光シグナルを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出した。画像解析ソフトウェアを用いて1細胞当たりに取り込まれたVLP数を定量した。この際、M224/1抗体、ならびに、エンドソームの酸性化およびマクロピノサイトーシスの阻害薬であるNH₄ClおよびEIPAを用いて、VLPの細胞への取込みに

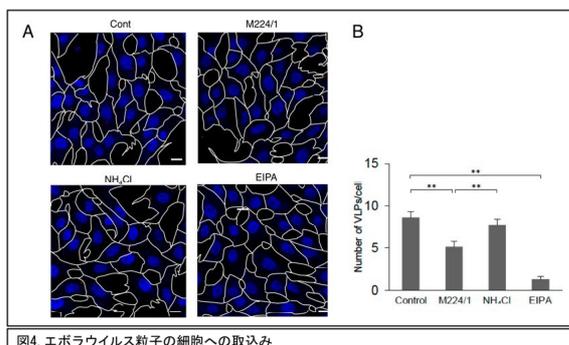


図4. エボラウイルス粒子の細胞への取込み

に対する影響を検討した。その結果、M224/1抗体は、取込みを有意に阻害することが明らかになった。しかしながら、その効果はEIPAほど顕著ではなかった。一方、NH₄ClはVLPの取込みにほとんど影響を与えなかった(図4、Kuroda *et al.*, *in press*)。

(3) エボラウイルス様粒子のエンベロープとエンドソーム膜との融合効率の評価

Rab7-eGFPを発現させたVero-E6細胞に蛍光標識VLPを室温で30分間吸着させた後、37°Cで4時間インキュベーションした。トリプシン処理により、細胞表面に残存したVLPを除去後、細胞内のVLP由来の蛍光シグナルを、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出した。画像解析ソフトウェアを用いて取り込まれたVLPの平均蛍光強度とサイズを定量することで膜融合効率を測定した。この際、M224/1抗体ならびに、NH₄Clを用いて、膜融合に対する影響を検討した。その結果、M224/1抗体はNH₄Clと同様、膜融合を有意に阻害することが明らかになった(図5、Kuroda *et al.*, *in press*)。

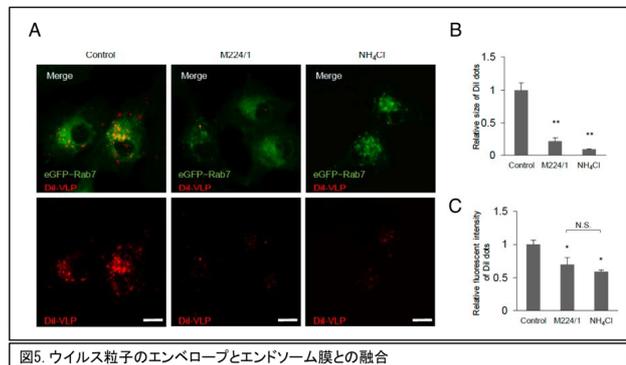


図5. ウイルス粒子のエンベロープとエンドソーム膜との融合

(4) 今後の展開

以上、エボラウイルスの細胞への侵入過程を構成する過程のうち、細胞表面への吸着、細胞への取込み、エンドソームとの膜融合の効果を定量化することに成功した。現在、ハイコンテンツイメージングシステムを用いたスクリーニング系の最適化を試みている。今後siRNAスクリーニングを実行し、各種侵入過程に関与する宿主因子を同定し、さらに各種候補宿主因子の侵入における役割について作用機序の解明を試みる予定である。

以上、本研究を発展させることで、エボラウイルスの侵入機構の分子基盤を解明することに加えて、将来的な抗エボラウイルス薬の開発へと展開するための基礎研究の基盤を確立できることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Strong MJ, Baddoo M, Nanbo A, Xu M, Puetter A, Lin Z., Comprehensive RNA-seq analysis reveals contamination of multiple nasopharyngeal carcinoma cell lines with HeLa cell genomes., **J Virol.**, 査読有, vol. 88, No.18, 2014, pp. 10696-10704, DOI: 10.1128/JVI.01457-14

Fujioka Y, Tsuda M, Nanbo A, Hattori T, Sasaki J, Sasaki T, Miyazaki T, Ohba Y., A Ca²⁺-dependent signalling circuit regulates influenza A virus internalization and infection. **Nat Commun**, 査読有, vol. 4, 2013, pp. 2763, DOI: 10.1038/ncomms3763

Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, Yoshiyama H, Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized *via* caveolae-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in the target cells. **J Virol**, 査読有, vol. 87, No. 18, 2013, pp. 10334-10347, DOI: 10.1128/JVI.01310-13

Nanbo A, Watanabe S, Halfmann P, Kawaoka Y, The spatio-temporal distribution dynamics of Ebola virus proteins and RNA in infected cells, **Sci Rep**, 査読有, vol. 3, 2013, pp. 1206, DOI: 10.1038/srep01206

[学会発表](計13件)

Nanbo A, Bio-imaging of entry process of Ebolavirus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), Jan 28, 2015, Academia Sinica (Taipei, Taiwan) (招待講演)

南保明日香：ウイルス感染の分子機構～ウイルスと宿主間相互作用～第10回九大・北大合同活動報告会、平成27年1月10日、都市センターホテル(東京)(招待講演)

黒田誠、藤倉大輔、南保明日香、野依修、梶原将大、丸山隼輝、宮本洋子、吉田玲子、高田礼人：細胞間接触を介した上皮細胞へのEBV伝播の分子機構に関する研究、第62回日本ウイルス学会学術集会、平成26年11月10日、パシフィコ横浜会議センター(横浜市)

南保明日香、吉山裕規、大場雄介：細胞間接触を介した上皮細胞へのEBV伝播の分子機構に関する研究、第62回日本ウイルス学会学術集会、平成26年11月10日、パシフィコ横浜会議センター(横浜市)

南保明日香：ウイルス-宿主相互作用を可視化する、第87回日本生化学会大会シンポジウム「蛍光・発光タンパク質を使ったイノベーション」平成26年10月15日、国立京都国際会館(京都市)(招待講演)

Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, Yoshiyama H : Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized *via* caveolae-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in the target cells. 2014 ASEM Annual Meeting, Oct 11, 2014. Asilomar Conference Center, (Monterrey, USA)

Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, Yoshiyama H Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized *via* caveolae-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in the target cells. International Hepes Virus workshop. July 20, 2014. Kobe international convention center (Kobe)

南保明日香、吉山裕規、大場雄介：細胞間接触を介した上皮細胞へのEBV伝播の分子機構に関する研究、第11回EBウイルス研究会、平成26年6月27日、国立感染症研究所(東京)

Nanbo A, Watanabe S, Halfmann P, and Kawaoka Y. The spatio-temporal distribution dynamics of Ebola virus proteins and RNA in infected cells, 6th Filovirus Symposium, March 31, 2014. Hotel Galvez (Galveston, USA)

Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, Yoshiyama H: Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized *via* caveolae-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in the target cells. EBV 50. March 23-25, 2014. Keble college (Oxford, UK)

南保明日香、川西絵理、吉田龍二、吉山裕規：EBV感染B細胞が放出するエキソソームの機能解析、第61回日本ウイルス学会学術集会 平成25年11月11日、神戸国際会議場(神戸市)

南保明日香、川西絵理、吉田龍二、吉山裕規：EBV感染B細胞が放出するエキソソームの機能解析、第10回EBウイルス研究会、平成25年7月12日、キャンパスプラザ京都(京都)

南保明日香、川西絵理、吉田龍二、吉山裕
規：EBV感染B細胞が放出するエキソソ
ームの機能解析 第28回ヘルペスウイル
ス研究会 平成25年5月31日、淡路夢舞
台国際会議場(淡路)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：フィロウイルス感染阻害剤のスクリー
ニング法

発明者：高田礼人，南保明日香，黒田誠，藤
倉大輔

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2014-210419

出願年月日：平成26年10月15日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://cp.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南保 明日香 (NANBO, Asuka)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60359487